

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lea Biličić
Uloga miRNA u regulaciji proteina uključenih u patološke procese
Alzheimerove bolesti

Završni rad

Rijeka, 2018.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Preddiplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Lea Biličić

Uloga miRNA u regulaciji proteina uključenih u patološke procese
Alzheimerove bolesti

Završni rad

Rijeka, 2018.

Mentor: dr.sc. Miranda Mladinić Pejatović

Završni rad obranjen je dana _____

pred povjerenstvom:

Rad ima 43 stranice, 7 slika, 1 tablicu i 48 literaturnih
navoda.

Sažetak:

Alzheimerova bolest (AD) je najučestalija degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava od koje boluje više od 48 milijuna ljudi i predstavlja 5. najčešći uzrok smrti u svijetu. AD obilježava povišena razina β amiloidnih peptida ($A\beta$ peptida) i hiperfosforiliranih Tau proteina koji uzrokuju gubitak sinapsi te odumiranje neurona. Bolest se javlja u dva oblika (sporadični i nasljedni), a njihovom nastanku pridonose brojni genetički i okolišni čimbenici. Sporadični oblik AD je uglavnom nepoznata uzroka, dok je nasljedni oblik posljedica mutacija na kromosomima 14 (gen za presenilin 1), 1 (gen za presenilin 2) i 21 (gen za amiloidni prekursorski protein). Tijekom napredovanja bolesti, koje obično traje od tri do devet godina, javlja se gubitak pamćenja, dezorijentiranost u prostoru, promjena osobnosti, a naposljetku dolazi do cjelokupnog poremećaja kognitivnih sposobnosti te smrti oboljelih. Još uvijek nije otkriven djelotvoran lijek koji bi spriječio ili odgodio razvoj bolesti, već zasad postoje lijekovi koji u manjoj mjeri poboljšavaju kogniciju i pamćenje bolesnika u ranijim stadijima bolesti. Brojni proteini su uključeni u patološke procese prisutne u AD, a njihova ekspresija je uz ostalo kontrolirana i modulirana malim nekodirajućim RNA molekulama (miRNA). Komplementarnim vezanjem za nekodirajuća područja mRNA molekula, miRNA reguliraju ekspresiju proteina na posttranskripcijskoj razini i održavaju homeostazu staničnih procesa. Smatra se da promjene u ekspresiji miRNA dovode do poremećene regulacije aktivnosti brojnih proteina i promjene u njihovoj funkciji te posljedično i do patoloških procesa koji dovode do razvoja AD. Kako promjene u ekspresiji miRNA nastupaju prije manifestiranja simptoma AD, one predstavljaju potencijalan dijagnostički biomarker za rano otkrivanje bolesti. Razumijevanje uloge miRNA molekula u nastanku i razvoju AD moglo bi pridonijeti razvoju novih postupaka u dijagnostici i liječenju ove bolesti.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, $A\beta$ peptida, Tau proteina, miRNA

Summary:

Alzheimer's disease (AD) is the most common degenerative disease of the central nervous system, affecting more than 48 million people worldwide and it is the fifth leading cause of death. AD is characterized by the elevated levels of A β peptides and hyperphosphorylated Tau protein which cause synapse loss and neuronal apoptosis. There are two forms of the disease (sporadic and hereditary), and both are influenced by different genetic and environmental factors. The cause of the sporadic form of AD is still unknown, while hereditary AD is caused by a mutation on chromosome 14 (presenilin-1 gene), 1 (presenilin-2 gene) and 21 (Amyloid precursor protein gene). During the progression of AD, which usually lasts from 3 to 9 years, memory loss, space and time disorientation, change of personality, and finally cognitive decline and death occur. At the moment there isn't any effective drug for treating AD, yet some medicines can improve cognition and memory of patients in the earlier stages of the disease. A lot of proteins are involved in pathological processes present in AD and their expression is partially modulated by small non-coding RNA molecules, miRNAs. By complementary binding within the three prime untranslated regions of mRNA, miRNAs regulate protein expression on posttranscriptional level, thus contributing to the homeostasis of cellular processes. It is believed that changes of miRNAs expression cause dysregulated activity and altered function of many proteins which contributes to pathological processes and progression of AD. miRNA is one of the potential diagnostic biomarkers in AD, as changes in miRNA expression occur before appearance of the specific symptoms. Understanding the role of miRNA in occurrence and progression of AD could contribute to the early diagnosis and treatment of this disease.

Key words: Alzheimer's disease, A β peptides, Tau protein, miRNA

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Svrha rada	5
3. Procesuiranje miRNA	6
4. Egzosomi	8
5. Proteini uključeni u patološke procese AD	10
5.1. Amiloidni prekursorski protein	10
5.2. β sekretaza	11
5.3. α sekretaze	13
5.4. γ sekretaza	14
5.4.1. Presenilin 1	15
5.4.2. Presenilin 2	15
5.4.3. Nikastrin	15
5.4.4. Prednji defektivni farinks homolog A	16
5.5. Neprilisin	16
5.6. Tau proteini	18
5.7. Acetilacija	20
6. Polimorfizmi apolipoproteina	21
7. Utjecaj okolišnih čimbenika na razvoj AD	22
7.1. Ceramid	22
7.2. Kolesterol	23
8. Uloga miRNA u induciranju i modulaciji upalnih procesa u AD bolesti .	24
9. miRNA kao potencijalni markeri za ranu dijagnostiku AD: najprikladniji uzorci za izolaciju i detekciju miRNA	25
10. miRNA i druge neurodegenerativne bolesti	26
11. Potencijalna terapija u liječenju AD	26
12. Uloga pojedinih miRNA u patogenezi AD	27
12.1. miRNA 125b	28
12.2. miRNA 34a	29
12.3. miRNA 137	30
12.4. miRNA 181c	30
13. Zaključak	32
14. Literatura	33

1. Uvod

Alzheimerova bolest (AD) je progresivna neurodegenerativna bolest od koje boluje 48 milijuna ljudi diljem svijeta. Jedna je od najučestalijih neurodegenerativnih bolesti i vodeći je uzrok nepovratne demencije. Uglavnom se javlja u starijoj životnoj dobi te je učestalija u ženskoj populaciji. Bolest karakterizira agregacija ekstracelularnih A β peptida i stvaranje intracelularnih neurofibrilarnih čvorova koji uzrokuju gubitak sinapsi i apoptozu stanica [1].

Pripada skupini multifaktorijalnih složenih bolesti jer na njezin nastanak utječu genetski i okolišni čimbenici. AD prisutan u starijoj životnoj dobi je nepoznata uzroka (sporadični AD), dok AD koji se javlja u mlađoj životnoj dobi (nasljedni AD) je posljedica mutacija na kromosomima 14 (gen za presenilin 1), 1 (gen za presenilin 2) i 21 (gen za amiloidni prekursorski protein). Mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik AD su najčešće polimorfizmi jednog nukleotida (*eng. single nucleotide polymorphisms, SNPs*). SNPs se mogu javiti u kodirajućoj ili nekodirajućoj regiji određenog gena te nekodirajućem području smještenom između dva različita gena. SNPs unutar kodirajuće sekvence obično dovode do promjene u slijedu aminokiselina translatiranog proteina. S druge strane, SNP unutar nekodirajuće sekvence utječu na prekrajanje gena, vezanje transkripcijskih faktora, degradaciju miRNA te tako pridonose razvoju bolesti [2].

Razlikujemo tri stadija AD: početni, umjereni i uznapredovali. U prvom stadiju javlja se gubitak kratkotrajnog pamćenja, smanjena koncentracija i promjena osobnosti oboljelih. Umjereni stadij obilježava dezorijentacija u prostoru, otežana komunikacija, depresija i uznemirenost. Posljednji stadij bolesti rezultira potpunim gubitkom kognitivnih sposobnosti, otežanim gutanjem i povećanom sklonošću infekcijama [3].

Uočena je razlika u učestalosti pojavljivanja bolesti između različitih geografskih područja. Najveći broj oboljelih (10,5 milijuna) zabilježen je u

Europi, dok je najmanje oboljelih zastupljeno u Africi (4 milijuna), što je vezano za prosječnu starost stanovništva [4]. Iako u Hrvatskoj ne postoje točni statistički podaci o broju oboljelih od AD, pretpostavlja se kako broj oboljelih premašuje 60 000 [5].

Žene su podložnije razvoju AD za razliku od muškaraca iste dobne skupine. Jedan od razloga veće učestalosti AD u žena je smanjena razina estrogena koja se javlja uslijed menopauze. Estrogen ima bitnu ulogu u zaštiti neurona inhibiranjem aktivnosti enzima koji pogoduju nastanku A β peptida [6]. Nadalje, estrogen povećava ekspresiju GLUT-a (*eng. glucose transporter*) koji olakšava prijenos glukoze preko stanične membrane. Kako glukoza predstavlja glavni izvor energije za moždane stanice, uslijed smanjene količine estrogena, ekspresije GLUT-a i transporta glukoze dolazi do odumiranja neurona. Tijekom napretka bolesti uočeno je smanjene količine receptora estrogena na mikroglija stanicama. Vezanjem estrogena za receptore dolazi do aktivacije neuroprotektivnih mikroglija, te aktivirane mikroglije osiguravaju metaboličku i ionsku homeostazu moždanog tkiva, imaju ulogu u sinaptičkoj transmisiji te djeluju kao makrofazi koji pružaju zaštitu neuronima fagocitirajući mikroorganizme i mrtve stanice. Smanjene količina estrogena i njihova receptora stoga pogoduje bržoj progresiji bolesti.

Sadašnji i budući lijekovi za liječenje AD

Svi danas dostupni lijekovi usmjereni su na liječenje posljedica AD, a ne samog njenog uzroka. Oni djelomično poboljšavaju kogniciju pacijenata, ali ne liječe niti usporavaju bolest.

AD karakterizira smanjena količina kolinergičnih neurona koji sintetiziraju neurotransmiter acetilkolin na svojim terminalnim dijelovima. U liječenju se stoga koriste inhibitori kolinesteraze poput Takrina. Blokirajući enzime koji razgrađuju acetilkolin, nastoji se povećati njegova koncentracija u organizmu.

Nadalje, u oboljelih od AD dolazi do prekomjerne stimulacije NMDA receptora glutamatom, a lijekovi poput Memantina djeluju kao antagonisti NMDA receptora i time umanjuju eksitotoksičnost koja uzrokuje propadanje moždanih stanica. Navedeni lijekovi su slabo djelotvorni jer ne liječe niti usporavaju bolest, već samo kod malog postotka pacijenata ograničeno poboljšavaju kogniciju i pamćenje [1], [7].

U skorije vrijeme provedena su istraživanja usmjerena na izoliranje monoklonalnih protutijela iz zdravih starijih ljudi koji nemaju simptome AD, jer se pretpostavilo da je njihov imunološki sustav „nadjačao“ AD [8]. Na ovoj ideji razvija se imunoterapijski pristup liječenju AD koji bi se temeljio na korištenju protutijela koja bi mogla spriječiti nastajanje A β ili neurofibrilarnih agregata. Naime, dizajniraju se protutijela koja se specifično vežu za A β monomere te time mijenjaju njihovu sekundarnu strukturu u konformaciju koja je manje sklona stvaranju agregata. Nadalje, najnoviji oblici imunoterapije usmjereni su na razvoj protutijela koja selektivno prepoznaju A β dimere. Poteškoće vezane za imunoterapijski pristup liječenju AD vezane su za brojne nuspojave poput glavobolje, vrtoglavice, te razvoj meningoencefalitisa i moždanog edema kod nekih pacijenata [9].

Istražuje se i mogućnosti liječenja AD koja bi se temeljila na modifikaciji djelovanja sekretaza koje selektivno cijepaju prekursorski amiloidni protein (*eng. amyloid precursor protein, APP*). Naime, nastoje se dizajnirati lijekovi koji bi selektivno inhibirali patološke aktivnosti sekretaza (inhibitori sekretaza, modulatori γ sekretaze ili pojačivači α sekretaze; [10]) Pri razvoju ovakvih lijekova značajnu poteškoću predstavlja problem prolaza protutijela kroz krvno-moždanu barijeru, te stoga modifikacije navedenih enzima nisu još rezultirale razvojem djelotvornog lijeka.

Novija istraživanja u malom postotku ukazuju na pozitivne učinke nesteroidnih protuupalnih lijekova koji selektivno reguliraju γ sekretazu (ibuprofen) te lijekova koji djeluju kao kelatori metala agregiranih u A β plakove (kliokinola) [1, 6].

Biomarkeri za dijagnostiku AD

U početnim stadijima AD kod većine pacijenta ne pojavljuju se uočljivi simptomi, već se bolest uglavnom otkriva u uznapredovaloj fazi. Novija istraživanja su usmjerena na pronalazak dijagnostičkih biomarkera koji bi se mogli detektirati u početnoj fazi bolesti. Ranijim otkrivanjem AD mogao bi se usporiti razvoj bolesti i olakšati život oboljelih.

Potencijalni dijagnostički biomarkeri za AD su male nekodirajuće RNA molekule (miRNA). miRNA molekule imaju bitnu ulogu u regulaciji ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini. Svojim 5' krajem komplementarno se vežu za 3' UTR regiju (*eng. the three prime untranslated regions*) mRNA molekule te uzrokuju njezinu destabilizaciju, degradaciju te inhibiciju translacije. 92% ljudskih gena je pod kontrolom više od 1000 miRNA molekula. Njihova promijenjena aktivnost je odgovorna za različite patološke procese koji se javljaju u mnogim bolestima. Analizirajući prisutnost i razinu miRNA u uzorcima krvi ili cerebrospinalnog likvora, moguće je predvidjeti pojavu i razvoj određenih bolesti [11]. Isti gen može biti reguliran velikim brojem različitih miRNA molekula, kao što je uočena sličnost u promjeni aktivnosti istih miRNA u raznim bolestima [11], što otežava specifično određivanje biomarkera za pojedinu bolest. Iako su miRNA molekule potencijalni dijagnostički biomarkeri za rano otkrivanje AD, postoje brojna ograničenja u razvoju ovakvih dijagnostičkih metoda: koncentracija miRNA u krvi je vrlo malena, promjena aktivnosti miRNA može biti i rezultat okolišnih čimbenika, a kod oboljelih se mijenja ekspresija velikog broja miRNA koje mogu i ne moraju biti vezane za AD.

2. Svrha rada

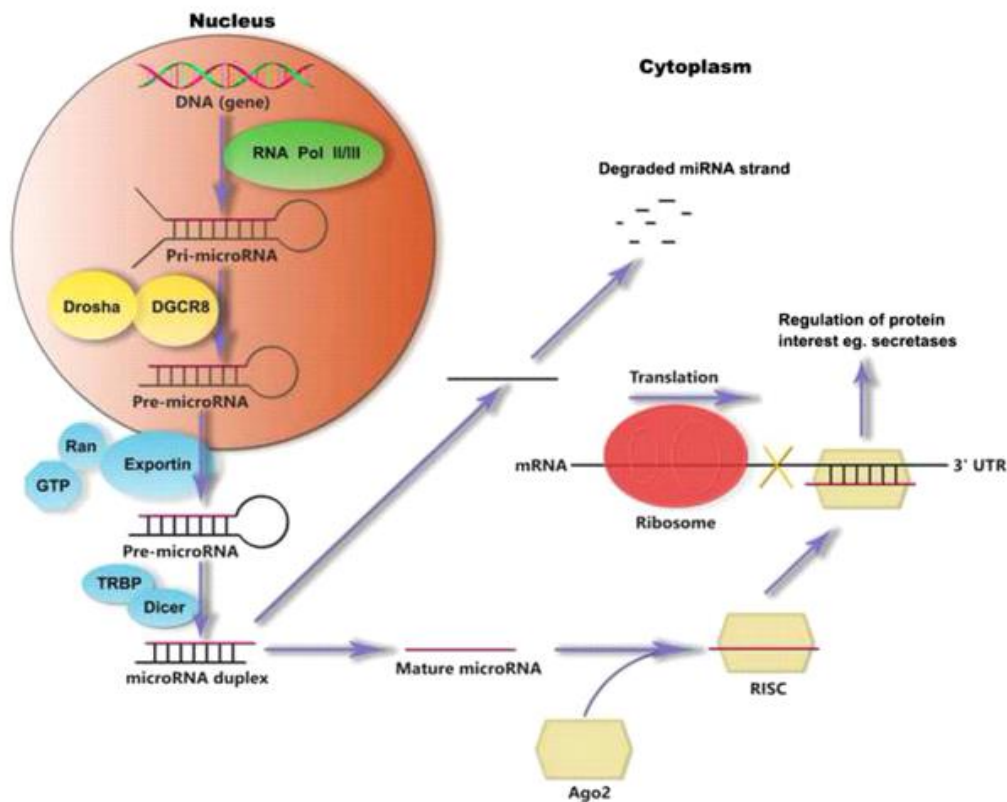
Cilj ovog osvrta je pobliže objasniti patologiju Alzheimerove bolesti, objasniti ulogu molekula (proteina, gena i miRNA) uključenih u patološke procese AD (posebno nastanak A β plakova i neurofibrilarnih čvorova), te prikazati utjecaj genetičkih i okolišnih čimbenika na nastanak i progresiju bolesti. Posebno će detaljno biti opisani rezultati istraživanja koji ukazuju na važnost regulatornih miRNA u AD (njihova funkcija i ciljne molekule djelovanja, detekcija u uzorcima krvi/cerebrospinalne tekućine kontrolnih skupine i oboljelih od AD, te učinci povišene/snižene aktivnosti miRNA na progresiju AD). Također, ovaj rad pružit će uvid u moderne terapijske pristupe koji uključuju korištenje sintetskih siRNA te anti-miRNA u razvoju budućih terapija za AD. U ovom preglednom završnom radu korištena je znanstvena i stručna literatura preuzeta napose iz baza podataka PubMed Central i ScienceDirect.

3. Procesuiranje miRNA

miRNA su male nekodirajuće molekule RNA koje imaju bitnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji ekspresije gena. Komplementarnim vezanjem za nekodirajuće područje na mRNA molekulama, miRNA utišavaju ekspresiju određenih gena i pridonose održavanju homeostaze staničnih procesa. Uključene su u brojne esencijalne biološke procese poput proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica, upalne procese te morfogenezu mozga. Promjena u ekspresiji miRNA uzrok je brojnim neurodegenerativnim bolestima. Ekspresija miRNA ovisi o epigenetskim modifikacijama poput DNA metilacije te modifikacije histona, a na njihovu stabilnost utječe velik broj enzima.

RNA polimeraza II je jedan od ključnih enzima uključenih u transkripciju miRNA. Enzim se veže na promotor DNA sekvence koja kodira za nastanak petlje na novonastajućoj miRNA molekuli. Nastali transkript prolazi kroz posttranskripcijske modifikacije; dodavanje niza gvanina na 5' kraju (metilirana kapa) te niza adenina na 3' kraju (poly-a-rep) miRNA molekule. Potom dolazi do izrezivanja nekodirajućih regija putem enzima spliceosoma. Naposljetku nastaje dugački primarni transkript koji se naziva pri-miRNA. Petlju RNA prepoznaje nuklearni protein DGCR8/DICER (*eng. diGeorge Syndrome Critical Region 8*) koji se spaja sa Drosha nukleazom (*eng. double-stranded RNA-specific endoribonuclease*) tvoreći mikroprocesorski kompleks koji cijepa pri-miRNA pri čemu nastaje pre-miRNA. Pre-miRNA se putem kompleksa exportina 5 transportira u citoplazmu. Enzim Dicer-TRBP (*eng. TAR-RNA binding protein*) uklanja omču pre-miRNA molekule. Preostaje kratak dupleks nukleotida koji se sastoji od vodećeg lanca i „passanger“ lanca. Lanac sa termodinamički stabilnijim 5' krajem („passanger“ lanac) se degradira nepoznatim mehanizmom, dok se vodeći lanac formira u zreli miRNA koja se spaja sa Argo (*engl. Argonaute*) proteinom stvarajući RISC (*eng. RNA-induced silencing complex*) (Slika 1).

RISC kompleksi nekih miRNA obavijaju se egzosomomima te nastavljaju daljnji transport do pronalaska specifične mRNA s komplementarnom 3' UTR regijom [12].



Slika 1: Prikaz procesa stvaranja zrele miRNA [12]

4. Egzosomi

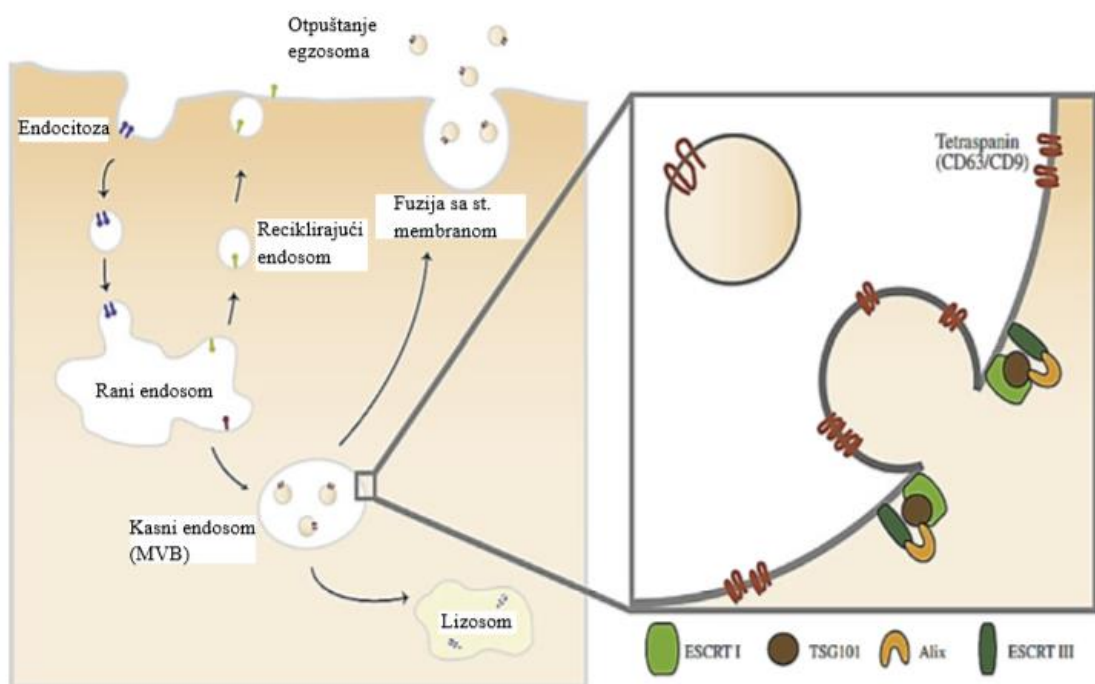
Slobodna, nevezujuća miRNA je ciljna meta brojnih egzonukleaza, no zahvaljujući egzosomima ona održava svoj integritet. Egzosomi su male sferične vezikule čija je glavna funkcija prijenos proteina, siRNA te miRNA do susjednih stanica. Potječu od multivezikularnih tjelešca, MVB (eng. *multivesicular bodies*). MVB su ispunjene intraluminalnim vezikulama koji se pupanjem membrane izbacuju u vanstanični prostor (egzosomi) ili se spajaju s lizosomima koji razgrađuju njihov sadržaj (Slika 2) [13].

Udruženje membranskih domena obogaćenih tetraspaninom-TEM (eng. *Tetraspanin - enriched membrane domains*) predstavlja početni korak u formiranju intraluminalnih vezikula. TEM sadržava brojne proteine poput CD9 i CD63 koji tvore „skelet“ za slaganje drugih proteina. Drugi korak uključuje formiranje ESCRT, kompleksa citosolnih proteina (engl. *endosomal sorting complex required for transport*). ESCRT I, ESCRT II, ESCRT III su odgovorni za proces pupanja membrane putem kojeg egzosomi odlaze u vanstanični prostor.

Egzosomi su ispunjeni različitim vrstama proteina; proteinima toplinskog šoka, transmembranskim proteinima, tubulinima, aneksinima te aktinima. Osim njihove uloge u reguliranju ekspresije gena na posttranskripcijskoj razini, reguliraju imunosni odgovor te spadaju u antigen prezentirajuće stanice. Iako reguliraju imunosni odgovor, egzosomi ga mogu i izbjegavati sudjelovanjem u virusnim infekcijama prenoseći virusne čestice između stanica. Nakon što se egzosomi odvoje od membrane mogu izbaciti svoj sadržaj u izvanstanični prostor ili ga transportirati do određene stanice. Stanica endocitozom uvlači sadržaj egzosoma u svoju unutrašnjost ili se proteini egzosoma pričvršćuju za receptore stanice te pokreću signalni put vođen sekundarnim glasnikom.

Egzosomi sudjeluju u neuralnoj komunikaciji između stanica što pridonosi neuralnoj regeneraciji i poboljšanju kognitivnih sposobnosti.

Određene miRNA molekule se putem egzosoma prenose od neurona do makroglija. U astrocitima miRNA 124a regulira ekspresiju pojedinih proteina, primjerice povećava ekspresiju glutamatnog transportera. Oligodendrociti sadrže egzosome ispunjene miRNA 219 koja povećava mijelinizaciju, poboljšava remijelinizaciju i smanjuje oksidativni stres [14].



Slika 2: Prikaz procesa nastanka intraluminalnih vezikula tijekom transformacije ranog endosoma u kasni endosom, tj. multivezikularno tijelo [13].

5. Proteini uključeni u patološke procese AD

5.1. Amiloidni prekursorski protein

Amiloidni prekursorski protein (APP) je integralni membranski glikoprotein koji ima bitnu ulogu u stvaranju sinapsi te neuroplastičnosti. APP je najzastupljeniji u moždanom tkivu, a u manjoj količini detektiran je u plućima, jetri, srcu i koži. Gen koji kodira za APP smješten je na 21. kromosomu, stoga duplikacija 21. kromosoma prisutna kod Down-ovog sindroma pogoduje nastanku bolesti. Iako funkcija APP-a nije u potpunosti razjašnjena, smatra se kako ima ulogu receptora za kojeg se vežu brojni proteini [15]. Stvara interakciju sa LRP (*eng. low-density lipoprotein receptor-related protein*), glavnim receptorom za apolipoprotein E. Nadalje, olakšava međusobnu adheziju stanica tako što se sa C-terminalnim krajem veže za proteine poput Dub1 (*eng. deubiquitinating enzyme 1*), Dub2 (*eng. deubiquitinating enzyme 2*) i Numb (*eng. endocytic adaptor protein*). Sastoji se od velike N-terminalne ekstracelularne domene, transmembranske regije (A β sekvence) i kratkog C-terminalnog citoplazmatskog repa (Slika 3) [16].

Gen za APP se sastoji od 19 eksona, a njihovim alternativnim prekrajanjem nastaju različite kombinacije što rezultira stvaranjem velikog broja proteina. U zdravih ljudi najzastupljeniji je APP695, dok je kod oboljelih od AD zabilježena povišena razina APP751.

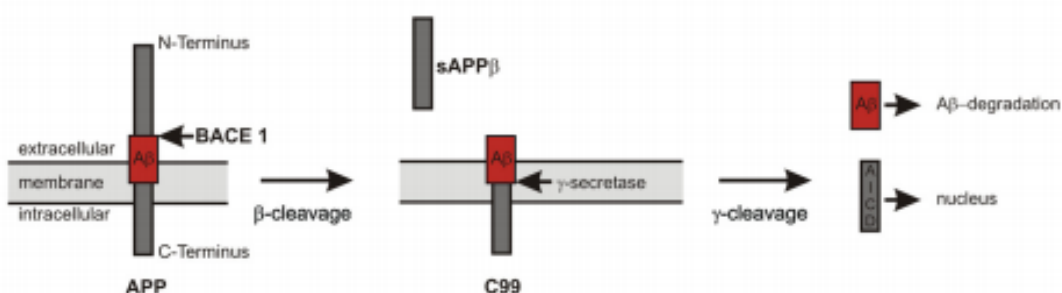
Vezanjem na 3'UTR cis regulatorne elemente, miRNA molekule reguliraju ekspresiju APP mRNA. SNP koji se javljaju unutar nekodirajuće regije miRNA, sprječavaju povezivanje sa mRNA i uzrokuju njezinu nepravilnu funkciju [17].

miRNA 147 regulira aktivnost mRNA koja kodira za APP. Posthumnom analizom moždanog tkiva oboljelih uočen je SNP T171C na miRNA 147 koji onemogućava interferenciju miRNA 147 sa mRNA za APP, što posljedično dovodi do povećane ekspresije APP i naposljetku do nakupljanja A β plakova.

5.2. β sekretaza

β sekretaza je transmembranski enzim čija je aktivnost zabilježena u velikom broju stanica i tkiva, posebice u neuronima. Javlja se u obliku proenzima, a nakon uklanjanja pro-domene postaje aktivan te obnaša svoju enzimatsku funkciju cijepanja APP-a. Procesuiranje APP se odvija u području N-terminalne ekstracelularne domene, te pritom nastaju topljivi sAPP β koji se otpušta iz stanice, te C-terminalni fragment (C99) koji ostaje ugrađen u membranu (Slika 3) [16]. sAPP β ima bitnu ulogu u neurološkim procesima poput sinaptogeneze i sinaptičke plastičnosti. C99 cijepa γ sekretaza pri čemu nastaje A β peptid koji odlazi u ekstracelularni prostor, te AICD (*eng. APP intracellular cytoplasmic domain*) podjedinica koja se zadržava unutar stanice. Nastali A β peptid najčešće sadržava 40 ili 42 aminokiseline. A β 42 je hidrofobniji i toksičniji, dok manje koncentracije A β 40 peptida imaju bitnu ulogu u procesu pamćenja i zaštiti od AD. Povećanjem koncentracije A β 40 i A β 42 peptida dolazi do promjene njihove konformacije iz α helikoidne strukture u β nabranu ploču. Promjena strukture olakšava međusobnu agregaciju ovih peptida pri čemu nastaju oligomeri, fibrili i naposljetku plakovi. A β plakovi stupaju u interakciju sa susjednim stanicama te uzrokuju promjenu u njihovoj funkciji. A β plakovi induciraju endocitozu N-metil-D-aspartat receptora (NMDA), jednog od ključnih regulatora sinaptičke plastičnosti. Nadalje, vezanjem A β 42 za nAChR (*eng. α -7 nicotinic acetylcholine receptor*) dolazi do smanjene kolinergičke transmisije i oslabljivanja sinapsi [15].

Amyloidogenic APP processing pathway:

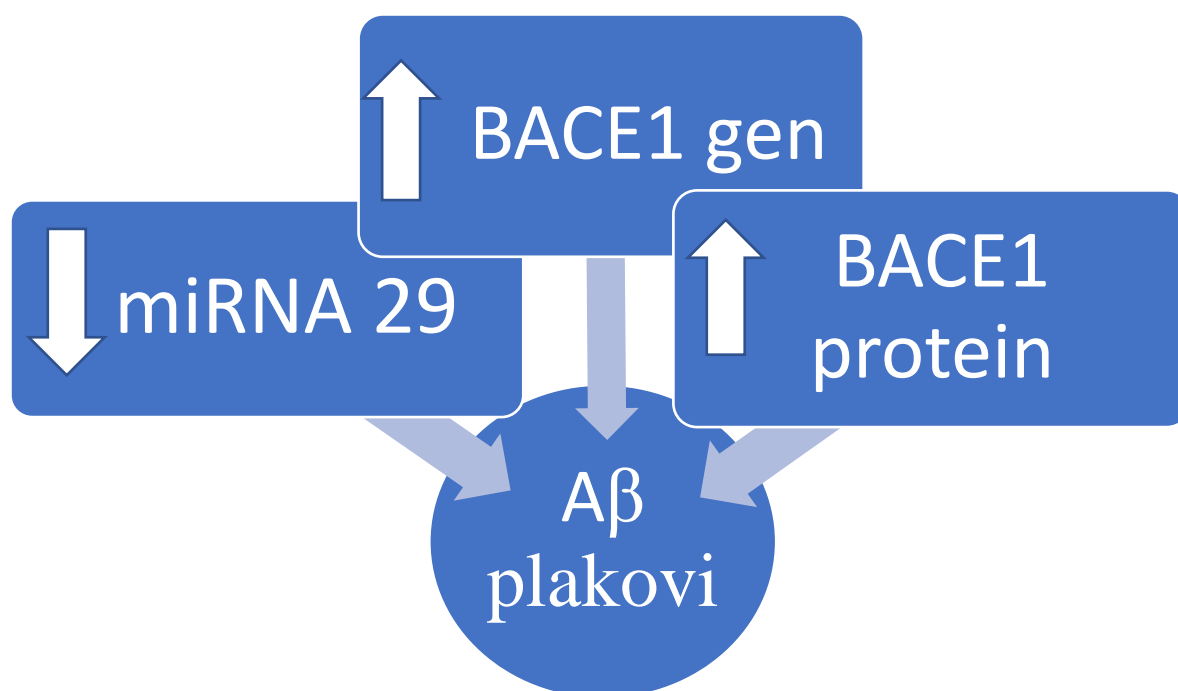


Slika 3: Prikaz procesuiranja APP djelovanjem β i γ sekretaza [16].

Povećana količina A β plakova u mozgu korelira s povećanom količinom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, *eng. reactive oxygen species*). ROS aktiviraju brojne kinaze koje potom fosforiliraju Tau proteine. Hiperfosforilirani Tau proteini stvaraju neurofibrilarne čvorove koji ometaju stvaranje sinaptičkih veza te prijenos signala među neuronima. Posthumnom analizom moždanog tkiva AD pacijenata utvrđeno je kako postoji slaba povezanost između količine A β plakova te progresije bolesti. A β plakovi su dakle indirektno povezani s bolešću jer promoviraju nastanak neurofibrilarnih čvorova čija je razina u korelaciji s napretkom bolesti. Procesuiranje APP djelovanjem β sekretaze nije isključivo u osoba oboljelih od AD. Naime, nastanak A β peptida dio je metaboličkih procesa koji se kontinuirano odvijaju u normalnim funkcionalnim stanicama. AD se javlja uslijed prekomjerne proizvodnje A β peptida uzrokovane nedostatnom aktivnošću α sekretaze i neprilisina koji sudjeluje u katabolizmu A β peptida [18].

Ekspresija specifičnih miRNA molekula utječe na razinu mRNA koja kodira za β sekretazu 1 (BACE1). miRNA 29c [19] se vežu na 3' UTR regiju BACE1 mRNA molekule, inhibirajući time njenu ekspresiju i posljedično translaciju, što dovodi do smanjene razine proteina β sekretaze. U oboljelih je zabilježena smanjena aktivnost velikog broja miRNA i povećana aktivnost BACE1. Razina BACE1 mRNA je u negativnoj korelaciji sa razinom miRNA 124 [20], jednoj od najučestalijih vrsta miRNA u mozgu. Inhibicijom ekspresije miRNA 124 dolazi do povećanja ekspresije BACE1 i narušavanja funkcije stanica. Nadalje, obitelj miRNA 29 molekula može služiti kako potencijalni biomarker u otkrivanju AD (Slika 4). Naime, posthumnom analizom moždanog tkiva i cerebrospinalnog likvora osoba oboljelih od AD uočena je snižena razina miRNA 29a. Također, kod miševa kojima je utišan gen za BACE1 mRNA 29c pronađena je u krvi udvostručena razina miRNA

29c u odnosu na normalne životinje, pa bi stoga ova molekula mogla biti dobar periferni biomarker za ranu detekciju AD [21].



Slika 4: Prikaz utjecaja promijenjenih razina miR 29, BACE1 gena i BACE1 proteaze na stvaranje Aβ plakova.

5.3. α sekretaze

α sekretaza je proteolitički enzim koji ima važnu ulogu u neamiloidnom cijepanju APP. α sekretaza ugrađena u staničnu membranu je konstanto aktivna, dok je aktivnost α sekretaze smještene unutar Golgijeva kompleksa pod utjecajem protein kinaze C (*eng. protein kinase C, PKC*). U Golgijevom kompleksu odvija se kompeticija α i β sekretaza za substrat - APP. Procesuiranje APP se odvija unutar Aβ sekvence pri čemu nastaje topljiva podjedinica sAPPα i podjedinica C83 (Slika 5) [16]. Vezanjem na neurotrofični receptor p75, sAPPα stimulira rast živčanih stanica. C83 zauzima neuroprotektivnu ulogu smanjujući stvaranje toksičnih Aβ peptida. α sekretaze spadaju u obitelj ADAM proteina (*eng. a disintegrin and metalloproteinase*) čija je glavna funkcija proteolitičko cijepanje

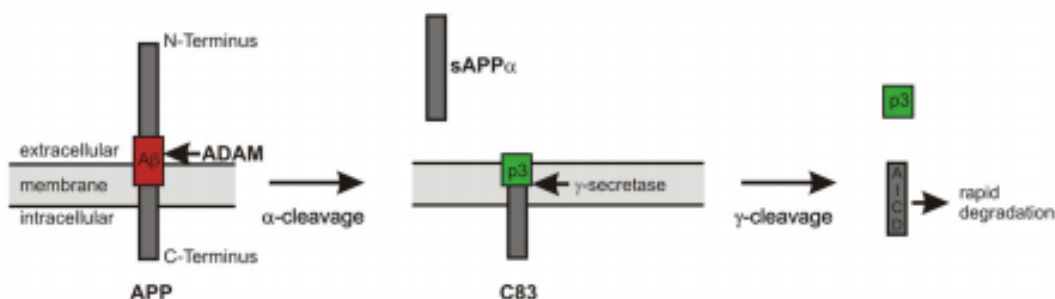
ekstracelularne domene transmembranskih proteina. ADAM10 (*eng. a Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) je primarna α sekretaza koja katalizira proteolitičko procesuiranje APP-a u mozgu. miRNA 103/107/306 reguliraju količinu α sekretaza direktnim vezanjem za ADAM10 3' - UTR. Kod oboljelih uočena je povećana ekspresija navedenih miRNA i posljedično manja količina α sekretaze te neuroprotektivnog sAPP α [22].

5.4. γ sekretaza

γ sekretaza je proteinski kompleks sastavljen od četiri transmembranske proteaze: presenilina 1 (*eng. presenilin1*, PS1), presenilina 2 (*eng. presenilin2*, PS2), nikastrina (*eng. nicastrin*, NCSTN) i prednjeg defektivnog farinks 1 homologa A (*eng. anterior pharynx defective 1 homolog A*, APH1A). Nakon cijepanja APP djelovanjem α sekretaze na sAPP α i C83, γ sekretaze nastavljaju daljnju proteolizu. Procesuiranjem C83 fragmenta dolazi do stvaranja p3 podjedinice koja odlazi u ekstracelularni prostor i AICD fragmenta koji ostaje unutar stanice (Slika 5) [16].

Neki proteini poput GSAP (*eng. gamma-secretase activating protein*) utječu na aktivnost γ sekretaza. Kada se ovaj protein veže za γ sekretazu, povećava se njegov afinitet i selektivnost za APP. Razne vrste miRNA direktno reguliraju podjedinice γ sekretaze i smanjuju patološko procesuiranje APP-a [23].

Non-amyloidogenic APP processing pathway:



Slika 5: Prikaz procesuiranja APP djelovanjem α i γ sekretaza [17]

5.4.1. Presenilin 1

Presenilin 1 (PS1) je proteolitički enzim koji zajedno s ostalim podjedinicama γ sekretaze sudjeluje u stvaranju A β plakova. Osim interakcije s ostalim katalizatorima, može djelovati i samostalno cijepajući transmembranski *Notch* receptor koji ima bitnu ulogu u staničnoj komunikaciji. Povećana količina PS1 ubrzava stvaranje i nakupljanje A β plakova. Katalizira stvaranje dužih i toksičnijih oblika A β peptida koji potom agregiraju u A β plakove. Kod miševa oboljelih od AD uočena je korelacija između razine PS1 i miRNA 9; smanjena količina miRNA 9 dovodi do povećane količine PS1 [24].

5.4.2. Presenilin 2

Presenilin 2 (PS2) procesuira proteine koji prenose iz stanične membrane u jezgru specifične kemijske signale uključene u aktivaciju gena važnih za stanični rast i sazrijevanje.

Detektirano je najmanje 11 mutacija u genu za PS2 koje stvaraju nefunkcionalan PS2 koji dovodi do prekomjernog stvaranja A β 42 peptida. Mutacije najčešće uzrokuju promjenu u jednoj aminokiselini: dolazi do zamjene aspargina sa izoleucinom na poziciji 141 te metionina valinom na poziciji 239. miRNA 146a/b regulira ekspresiju PS2 gena tako da povećane količine PS2 prate smanjene razine miRNA 146a/b [24].

5.4.3. Nikastrin

Nikastrin je glikoprotein koji utječe na sazrijevanje i lokalizaciju ostalih podjedinica γ sekretaze. Stupa u interakcije te regulira aktivnost neprilisina, enzima koji katalizira degradaciju A β peptida.

Unutar kodirajuće regije mRNA za nikastrin nalaze se specifična mjesta na koje se vežu miRNA molekule i tako kontroliraju njihovu ekspresiju. Kod

oboljelih od AD uočena je smanjena ekspresija miRNA 16 što posljedično dovodi do povećane aktivnosti nikastrina, γ sekretaze i stvaranja A β plakova [23].

5.4.4. Prednji defektivni farinks homolog A

Prednji defektivni farinks 1 homolog A (APH1) je podjedinica γ sekretaze građena u obliku α -uzvojnice s ponavljajućim motivom glicin-x-x-x-glicin (G-x-x-x-G). Regulira sazrijevanje presenilina i lokalizaciju nikastrina u staničnu membranu. Komplementarnim vezanjem miRNA 324-5p za 5' UTR regiju APH1 mRNA dolazi do reguliranja ekspresije ovog proteina. Polimorfizmi koji ometaju interakciju miRNA-APH1A mRNA dovode do povećane količine APH1A što pridonosi nakupljanju A β plakova i razvoju AD [25].

5.5. Neprilisin

Neprilisin je integralni membranski glikoprotein poznat i kao membranska metaloendopeptidaza (*eng. membrane metallo-endopeptidase*, MME), neutralna endopeptidaza (*eng. neutral endopeptidase*, NEP) i klaster diferencijacije 10 (*eng. cluster of differentiation 10*, CD10). Gen koji kodira za NEP sadrži 24 eksona iz kojih procesom alternativnog prekrajanja kod ljudi nastaju 4 varijante (transkripta). Translacijom jedne od varijanata nastaje protein NEP1 koji se sastoji od dvije hidrofobne domene (ekstracelularne i citosolne) te jedne hidrofilne domene. NEP1 cijepa peptide na amino strani hidrofobnih ostataka i deaktivira različite peptidne hormone poput glukagona, oksitocina ili neurotenzina. Uzrokuje degradaciju monomernih te oligomernih forma A β peptida cijepanjem peptidne veze na poziciji Gly9-Tyr10. Aplikacija NEP inhibitora u mišjem modelu rezultirala je povećanjem količine A β plakova. S druge strane, povećana ekspresija NEP gena dovela je do smanjenog nakupljanja A β plakova.

U oboljelima od AD zabilježena je smanjena aktivnost hormona somatostatina koji djeluje kao regulator aktivnosti NEP.

Starenjem dolazi do smanjenja aktivnosti somatostatina i NEP. Disregulacija aktivnosti NEP pridonosi nakupljanju A β peptida i njihova oligomeriziranja u A β plakove.

Uočena je korelacija između oksidativnog oštećenja i aktivnosti NEP. Naime, u plućnom tkivu oboljelih pronađene su visoke količine nepravilno oksigeniziranog NEP.

Kod oboljelih od AD gen MME koji kodira za NEP je utišan, dok je primjerice kod oboljelih od melanoma prekomjerno eksprimiran. MME gen posttranskripcijski je reguliran djelovanjem miRNA 216. Utišavanje 30 kb dugog područja na 11 kromosomu (MME gen) mišjeg modela pokazalo se letalnim [26].

5.6. Tau proteini

Tau proteini imaju bitnu ulogu u stabilizaciji mikrotubula i održavanju njihove fleksibilnosti. Iako su lokalizirani posvuda u neuronima, primarno su vezani na mikrotubule aksona. Nastaju alternativnim prekrajanjem MAPT (*eng. Microtubule-associated protein Tau*) gena koji se nalazi na kromosomu 17q21 te se sastoji od 16 eksona. Alternativnim prekrajanjem eksona 2,3,10 nastaje 6 različitih izoformi Tau proteina. Izoformni oblici Tau proteina razlikuju se po broju domena kojima se vežu za mikrotubule. Građeni su od četiri domene: N-terminalne domene i C-terminalne domene, domene bogate prolinom te tubulin-vezujuće domene. Vezujuće domene smještene su na karboksilnom kraju aminokiseline, pozitivno su nabijene te pokazuju velik afinitet prema negativno nabijenim mikrotubulima.

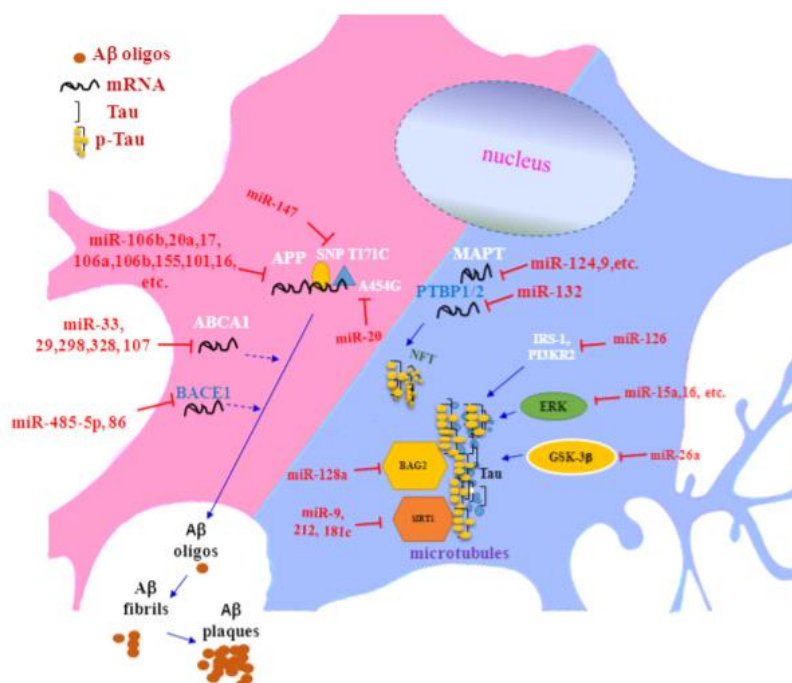
Ekson 10 nosi genetsku uputu za nastanak 3R i 4R izoformi. U zdravom organizmu prevladava jednaka zastupljenost 4R i 3R izoformi, no kod oboljelih dolazi do njihovog disbalansa. Na omjer izoformi mogu utjecati razne vrste miRNA [27].

miRNA molekule imaju važnu ulogu u regulaciji metabolizma Tau proteina. Promijenjeno djelovanje miRNA dovodi do nepravilnog prekrajanja MAPT gena i hiperfosforilacije Tau proteina. Konkretno, miRNA 124, miRNA 9, miRNA 132, miRNA 137 reguliraju prekrajanje MAPT gena (Slika 6). Kod oboljelih razine navedenih miRNA znatno su snižene.

Odvajanje hiperfosforiliranih Tau proteina od mikrotubula uzrokuje njihovu dezintegraciju (Slika 7). Dezintegracija mikrotubula narušava stabilnost citoskeleta odgovornog za prijenos tvari, gibanje i održavanje oblika stanice. Agregacijom nevezanih Tau proteina u paralelne helikalne filamente te neurofibrilarne čvorove dolazi do mitohondrijske i sinaptičke disfunkcije živčanih stanica. Neurofibrilarni čvorovi prošire se po cijelom neuronu uzrokujući puknuće membrane te smrt živčane stanice [7].

Glavni uzrok hiperfosforilacije Tau proteina predstavlja disbalans između aktivnosti kinaza i fosfataza: aktivnost kinaza je povećana, dok je aktivnost fosfataza smanjena.

Povećane razine ERK (*eng. extracellular signal-regulated kinases*), PKA (*eng. cAMP-dependent protein kinase*), MARK (*eng. microtubule-affinity-regulating kinase*) i GSK-3 (*eng. glycogen synthase kinase 3*) uzrokuju prekomjernu fosforilaciju Tau proteina što naposljetku dovodi do stvaranja neurofibrilarnih čvorova. Povećana aktivnost kinaza javlja se uslijed povećane količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) čiji je nastanak povezan s akumuliranjem A β plakova. Brojne miRNA su u stalnoj interakciji te predstavljaju regulatornu organizaciju koja pridonosi održavanju homeostaze metabolizma različitih proteina. Primjerice, miRNA 16 te miRNA 15a se komplementarno vežu za 3' UTR područje ERK1 mRNA, dok se miRNA 26a veže za 3' UTR područje GSK-3 β (Slika 6). Vezanjem miRNA za komplementarno područje na mRNA smanjuje se ekspresija određenih gena što rezultira sniženom aktivnošću navedenih kinaza. U oboljelih od AD zabilježena je snižena aktivnost navedenih miRNA. S druge strane, uočena je povećana aktivnost miRNA 138. Njezina meta je α receptor retinoične kiseline (RARA). RARA povećava aktivnost GSK-3 β koja potom prekomjerno fosforilira Tau proteine [28].



Slika 6: Uloga miRNA u depoziciji A β plakova i stvaranju neurofibrilarnih čvorova [28]

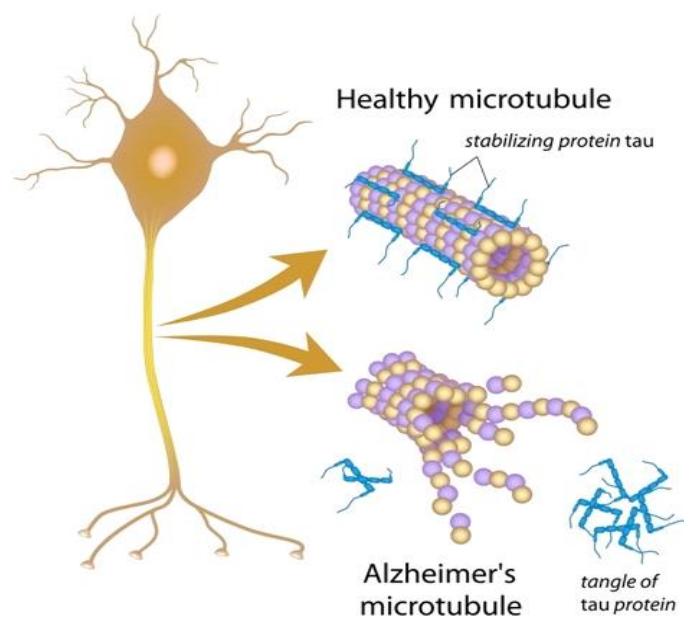
5.7. Acetilacija

Oksidativni stres i neuroinflamatacija induciraju acetilaciju koja pridonosi nakupljanju Tau proteina i njegovim slabijim vezanjem za tubulin. Acetilacija pridonosi stabilizaciji Tau proteina te spriječava njegovu ubikvitinizaciju. Nevezani Tau protein je podložan agregaciji te stvaranju neurofibrilarnih čvorova (Slika 7).

Lijekovi poput Salsalata reduciraju oksidativni stres i neuroinflamaciju što rezultira smanjenom acetilacijom i hiperfosforilacijom Tau proteina. Salsalat se još uvijek ne koristi za liječenje AD jer mehanizam djelovanja nije poznat [29].

Dodavanje acetilnih skupina katalizira acetiltransferaza p300, dok je uklanjanje acetilnih skupina pod utjecajem deacetilaze, sirtuina 1 (*eng. sirtuin 1*, SIRT1). Aktivnost acetilaze i deacetilaze kontroliraju specifične miRNA molekule. miRNA 9, miRNA 212 te miRNA 181c utišavaju gen koji kodira SIRT1 što rezultira povećanom acetilacijom Tau proteina.

Razgradnja hiperfosforiliranih Tau proteina odvija se interakcijom BAG2 (*eng. bcl2-associated athanogene 2*) i HSP70 proteina (*eng. the heat shock protein 70*). Navedeni formirani kompleks usmjerava hiperfosforilirane Tau proteine u proteosomalni put neovisan o ubikvitinu. Vežući se za 3'UTR područje BAG2 gena, miRNA 128a utišava njegovu ekspresiju. Naposljetku dolazi do manje sinteze proteina BAG2, manje proteosomalne razgradnje Tau proteina te njihova nakupljanja u živčanim stanicama. Interakcija između miRNA te Tau proteina predstavlja neprekidan ciklus u kojem promjena ekspresije jedne vrste miRNA uzrokuje prekomjernu fosforilaciju Tau proteina koji potom uzrokuju degradaciju drugih vrsta mRNA [28].



Slika 7: Usporedba neuronalnih mikrotubula iz pacijenata oboljelih od AD i zdravih osoba [30]

6. Polimorfizmi apolipoproteina

Mikroglia i astrociti proizvode apolipoprotein E koji je odgovoran za transport kolesterola do limfnog sustava i krvotoka. Gen za proizvodnju apolipoproteina E smješten je na 19. kromosomu te se javlja u tri alela: *APOE-ε2* (cys112, cys158), *APOE-ε3* (cys112, arg158) i *APOE-ε4* (arg112, arg158). Oni kodiraju nastanak tri proteina različitih funkcija i svojstava. Iako 40-60% oboljelih imaju najmanje jednu kopiju *ε4* alela, ne možemo ga definirati pouzdanim čimbenikom koji ukazuje na vjerojatnost razvijanja bolesti [31].

Apolipoproteini *APOE-ε2* i *APOE-ε3* olakšavaju proteolitičko cijepanje β amiloidnog peptida. S druge strane, *APOE-ε4* ima velik afinitet vezivanja na $A\beta$ peptide te pogoduje njihovoj agregaciji i nastanku $A\beta$ plakova. *APOE-ε4* transportira kolesterol manjom brzinom u usporedbi s ostalim

lipoproteinima što rezultira nakupljanjem kolesterola unutar lipidnih splavova. Veći broj lipidnih splavova pogoduje amiloidnom cijepanju APP-a i nastanku A β peptida. Ekspresija APO4 alela predstavlja rizični faktor za razvitak sporadičnog AD. Osobe s više od dvije kopije $\epsilon 4$ alela imaju 20 puta veći rizik razvoja bolesti. Unatoč tome trećina oboljelih od AD je APOE- $\epsilon 4$ negativna, a kod pojedinaca čije su APOE- $\epsilon 4$ homozigoti ne dolazi do razvoja AD [32].

7. Utjecaj okolišnih čimbenika na razvoj AD

7.1. Ceramid

Ceramid je lipidna molekula koja nastaje kondenzacijom sfingozina i masnih kiselina. Jedan je od gradivnih elemenata stanične membrane i mijelinske ovojnice neurona. Regulira diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu, migraciju te adheziju stanica. Utječe i na lokalizaciju određenih proteina te može uzrokovati nakupljanja A β plakova. Ceramid olakšava transport neaktivne BACE1 i γ sekretaze do lipidnih splavova gdje dolazi do njihove aktivacije te patološkog procesuiranja APP-a.

De novo sinteza ceramida započinje kondenzacijom L-serina i palmitoil-CoA pri čemu nastaje 3-dehidro-D-sfinganin. Nastajanje 3-dehidro-D-sfinganina predstavlja najsporiji korak u sintezi ceramida, a na brzinu njegova nastajanja utječe enzim serin palmoitil transferaza (SPT). miRNA 181c/137/29a,b kontroliraju aktivnost SPT putem degradacije miRNA ili posttranskripcijske supresije translacije proteina. Manja razina SPT dovodi do manje količine ceramida i posljedično smanjenog stvaranja A β plakova. U modelu miševa kod kojih je utišan Dicer gen zabilježena je snižena aktivnost prethodno spomenutih miRNA i povećana razina ceramida [33].

7.2. Kolesterol

Brojna istraživanja pokazala su kako miševi na prehrani s visokim udjelom masti ostvaruju lošije rezultate u testovima prostorne snalažljivosti. Poteškoće u pamćenju nastaju uslijed dezintegriteta neurona i kolinergične disfunkcije uzrokovanih nakupljanjem A β plakova i neurofibrilarnih čvorova. Amiloidno procesuiranje APP odvija se u blizini lipidnih splavova, membranskih mikrodomena ispunjenih kolesterolom koji inducira patološko procesuiranje APP. Regulirajući fluidnost membrane, kolesterol utječe na transport i lokalizaciju enzima uključenih u proteolitičko cijepanje APP [34]. miRNA 33 se veže za 3'UTR područje ABCA1 mRNA (*eng. ATP-binding cassette transporter*) i inhibira ekspresiju ABCA1 gena. ABCA1 prenosi kolesterol van stanice gdje se potom spaja s apolipoproteinima te nastaju lipoproteini visoke gustoće (*eng. HDL-high density lipoproteins*). Smanjena razina transportera kolesterola uzrokuje njegovo nakupljanje unutar membrane. Kolesterol povećava stvaranje A β peptida te pridonosi njihovom citotoksičnom efektu, no još uvijek nije istražen molekularni mehanizam utjecaja kolesterola na povećano stvaranje A β plakova.

Mutacije u miRNA dovode do promjene u njihovoj ekspresiji, te posljedično i u ekspresiji mRNA koja kodira za nastanak ABCA1, disregulaciji homeostaze kolesterola te akumulaciji A β peptida [35].

Novija istraživanja usmjerena su na razvoj statina, lijekova koji smanjuju razinu kolesterola. Uočena je niža stopa prevalencije AD kod srčanih bolesnika tretiranih lovastatinom i pravastatinom u usporedbi sa srčanim bolesnicima tretiranih lijekovima koji ne utječu na metabolizam kolesterola [36]. Statini su lijekovi koji inhibiraju HMG-CoA reduktazu koja katalizira nastanak mevalonata iz 3-hidroksil-3-metilglutaril CoA. Inhibicijom enzima koji katalizira ključan korak u sintezi kolesterola smanjuje se njegova razina i naposljetku dolazi do niže razine A β plakova.

8. Uloga miRNA u induciranju i modulaciji upalnih procesa u AD bolesti

Vezanjem miRNA za komplementarni slijed nukleotida koji kodira za APP i BACE1 kontrolira se translacija tih proteina. Disregulacijom miRNA 193b te miRNA 29c dolazi do prekomjernog stvaranja APP i BACE1 [19].

Naposlijetku dolazi do nakupljanja A β plakova koji uzrokuju gubitak neurona u području hipokampusa što uzrokuje poremećaj stvaranja dugoročnog pamćenja.

Egzosomalne miRNA mogu aktivirati receptore slične Tollu, TLR (*eng. Toll-like receptor*) koji se nalaze na površini membrane glij stanica. Sudjeluju u TLR-signalnim putevima regulirajući funkciju i ekspresiju njegovih komponenti. Ciljne molekule miRNA su signalni proteini, transkripcijski faktori, regulatorne molekule, citokini.

Oštećeni neuroni otpuštaju miRNA sa sekvencama bogatima nizovima gvanina i uracila (*eng. GU-rich element*) koje aktiviraju TLR-7 receptore. Vezanjem za TLR receptore dolazi do aktivacije signalnih puteva i transkripcijskih faktora koji transkribiraju gene za različite vrste proteina [37]. Uslijed aktivacije TLR-7 mikroglija dolazi do induciranja upalnih procesa otpuštanjem TNF- α i upalnih citokina. Iako mikroglija ima pozitivan učinak na stanice fagocitirajući amiloidne plakove, njena prekomjerna aktivacija pridonosi progresiji AD. Konstantno stvaranje citokina stimulira neurotoksične astrocite koji oštećuju neurone. Osim citokina i kemokina mikroglija otpušta ROS i time pridonosi stvaranju neurofibrilarnih čvorova. Aktivnost mikroglije se mijenja u različitim fazama bolesti, u uznapredovaloj fazi fagocitira sinapse i dovodi do potpunog gubitka kognitivnih sposobnosti [38]. Osim na membranama mikroglija, TLR-7 su ugrađeni u membrane neurona i makrofaga. Aktivacijom TLR-7 neurona stvaraju se kaspaze-3 koje stimuliraju apoptozu susjednih neurona.

Makrofazi predstavljaju antigen prezentirajuće stanice; fagocitiraju A β peptide i predočavaju ih u sklopu molekula MHC skupine II (*eng. major histocompatibility complex*) pomagačkim CD4⁺ limfocitima T. Oni potom

izlučuju citokine koji induciraju proliferaciju B stanica i proizvodnju specifičnih protutijela [39].

Dakle, promijenjena razina miRNA utječe na količinu transkripcijskih faktora, transkribiranih gena i translatiranih proteina. Disregulacija aktivnosti miRNA dovodi do upalnih procesa te apoptoze živčanih stanica.

9. miRNA kao potencijalni markeri za ranu dijagnostiku AD: najprikladniji uzorci za izolaciju i detekciju miRNA

Najčešće korišteni uzorci za detektiranje egzosomalne miRNA su cerebrospinalna tekućina (CSF, *eng. cerebrospinal fluid*) i krv. CSF cirkulira kroz unutrašnji ventrikularni sistem, prelazi krvno moždanu barijeru i integrira se u krvotok. Iako je CSF prikladan uzorak za detekciju egzosomalne miRNA, prikupljanje CSF je invazivan proces, stoga se miRNA najčešće prikuplja iz krvi. Egzosomalna miRNA se izolira iz plazme ili seruma dobivenih diferencijalnim ultracentrifugiranjem. Prikupljanje miRNA iz krvi je neinvazivan, pouzdan, jeftin i najprihvatljiviji način detekcije potencijalnih dijagnostičkih biomarkera. Iako je prikupljanje miRNA iz krvi jednostavna i učestala metoda, problem predstavlja vrlo niska razina miRNA što otežava njenu detekciju. Nije poznat mehanizam kojim egzosomalna miRNA prelazi krvno-moždanu barijeru i dolazi u krvnu plazmu. Patološka stanja u neurološkim poremećajima mogu uzrokovati perforaciju krvno-moždane barijere što uzrokuje konstantno otpuštanje staničnih komponenti.

Egzosomi se međusobno razlikuju po veličini, gustoći, obliku te ekspresiji membranskih proteina. Na temelju navedenih karakteristika postoje različiti načini izolacije egzosoma. Izoliranje egzosoma na temelju veličine provodi se ultrafiltracijom pomoću centrifugalnih kolonica. Dobivanje pročišćenih egzosoma postiže se korištenjem specifičnih monoklonalnih protutijela usmjerenih na određene membranske proteine egzosoma. Specifične

biljege egzosoma predstavljaju CD9, CD63, CD81, LAMP1 i TSG101 i aneksin V [14].

Novija istraživanja usmjerena su na analiziranje egzosomalne miRNA metodom sekvencioniranja (*eng. deep-sequencing method*). Sekvencioniranje je osjetljiva i precizna metoda u kojoj se određena sekvenca gena analizira nekoliko tisuća puta kako bi se uočila rijetka varijacija u slijedu nukleotida. Ona detektira promjene u metilaciji DNA te ekspresiji RNA nastalih uslijed djelovanja okolišnih čimbenika. Analizirajući slijed nukleotida ukazuje na genetičke modifikacije miRNA koje dovode do razvoja AD. Nakon sekvencioniranja, slijedi detekcija specifičnih miRNA pomoću RT-qPCR [40].

10. Potencijalna terapija u liječenju AD

Osim što mogu prenositi miRNA, egzosomi služe kao transporter sintetske ribonukleinske kiseline, primjerice siRNA (*eng. small interfering RNA*) koja ima potencijalnu terapijsku ulogu u liječenju AD.

Početni korak u stvaranju genetički modificiranih egzosoma zauzima izolacija hematopoetskih matičnih stanica iz jedinke miša. Hematopoetske matične stanice se stimuliraju određenim interleukinom kako bi diferencirale u dendritičke stanice. Potom se u njih unese RVG (*eng. Rabies Virus Glycoprotein*) [14]. RVG eksprimira plazmid koji sadrži informaciju za stvaranje egzosoma specifičnih za vezanje na određene živčane stanice. Nakon izolacije egzosoma iz dendritičkih stanica, u njega se metodom elektroporacije unosi siRNA. Intravenozni aplicirani egzosomi ulaze u krv, prelaze krvno moždanu barijeru i ulaze u centralni živčani sustav. Prenose GAPDH (*eng. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) siRNA koja uzrokuje utišavanje gena na mRNA koji kodira za BACE1. Stanica prepoznaje promijenjenu BACE1 mRNA te inducira njenu degradaciju. Degradacijom BACE1 miRNA onemogućava se stvaranja β sekretaze koja bi svojom enzimatskom aktivnošću dovela do formiranja A β peptida.

Jedna od potencijalnih pristupa u liječenju AD predstavlja anti-miRNA terapija. Unošenjem komplementarne RNA sekvence nastoji se inaktivirati prekomjerno ekspremirana miRNA. LNA (*eng. the miRNA-targeting locked nucleic acids*) se komplementarno veže za miRNA, onemogućava njeno vezanje za ciljnu mRNA i smanjuje njenu aktivnost. MiRNA djeluje na velik broj ciljnih mRNA, regulira brojne stanične procese, stoga zauzima središte modernih terapijskih pristupa [42].

11. Uloga pojedinih miRNA u patogenezi AD

U Tablici 1. izlistane su miRNA molekule za koje je dokazano da sudjeluju u patogenezi AD, te će uloga nekih od njih biti pobliže objašnjena u tekstu koji slijedi [43]

microRNA	Up/downregulation*	Intermediates	Major pathomechanism(s)
miRNA 139	Upregulation	CB2	Inflammatory regulation
miRNA 125b	Upregulation	p35, GSK3b, MAPK, Erk1/2, DUSP6, PPP1CA	Tau phosphorylation
miRNA 138	Upregulation	NMDA receptor subunit NR2A, p53, Bcl2 APT1, SIRT1, an NAD-dependent histone deacetylase RARA, GSK3b RARA, disintegrin, metalloprotease 10, c-secretase	Apoptosis neuronal plasticity Neuronal morphogenesis Tau phosphorylation, APP regulation
miRNA 101	Upregulation	29-nt <i>cis</i> -acting element	APP regulation
miRNA 200b	Downregulation	β -Secretase	APP regulation
miRNA 16	Upregulation		APP regulation
miRNA 195	Downregulation	P35/p25, NF- κ B, calpain, Cdk5	Tau phosphorylation
miRNA 26b	Upregulation	IGF-1	Tau phosphorylation and A β production
miRNA 98	Downregulation	IGF-1	Tau phosphorylation and A β production
miRNA 98-5-p	Upregulation	SNX6, BACE 1	A β aggregation
miRNA 153	Downregulation		APP and APLP2 protein
miRNA 219-5p	Downregulation	mRNA destabilization or translational repression	Tau production
miRNA 107	Downregulation	BACE 1	APP β cleavage
miRNA 186	Downregulation		
miRNA 29a/b-1	Downregulation		
miRNA 339-5p	Downregulation		
miRNA 384	Downregulation	A β 42, BACE1	APP β accumulation
miRNA 137-181c-9/-29a/b-1	Downregulation	Ceramides, NF-B, MeCP2, Sox2, Akt1, SPTLC	A β production
miRNA 29a	Downregulation	Ceramids, γ -secretase, BACE1 BACE1 NAV3	APP β accumulation APP β accumulation Regulator of axon guidance

11.1. miRNA 125b

miRNA 125b spada u najučestalije vrste miRNA u centralnom živčanom sustavu te zauzima bitnu ulogu u regulaciji enzima uključenih u Tau fosforilaciju.

Povećana ekspresija miRNA 125b inducira aktivaciju raznih vrsta kinaza koje prekomjerno fosforiliraju Tau proteine što dovodi do njihova odvajanja od mikrotubula te agregacije u neurofibrilarne čvorove. Povećana ekspresija miRNA 125b uzrokuje uvećanu aktivnost MAPK (*eng. mitogen activated protein kinase*) koje fosforiliraju te aktiviraju Cdk5 (*eng. cyclin dependent kinase 5*). Cdk5 je prolin usmjerena serin/treonin kinaza koja ima bitnu ulogu u sazrijevanju živčanog sustava. Signalnom kaskadom Cdk5 aktivira brojne kinaze koje fosforiliraju Tau proteine.

Na aktivnost Cdk5 utječu specifični aktivatori poput tumor supresorskog proteina p35 koji se sastoji od dva dijela, N-terminalnog p10 fragmenta i C-terminalnog p25 fragmenta. Uslijed izloženosti živčane stanice neurotoksičnim stresom dolazi do proteolitičkog cijepanja p35 u fragmente p25 i p10. P10 se obilježava ubikvitinom te usmjerava na razgradnju proteasomom, dok je p25 otporan na ubikvitin-posredovanu proteolizu te ima duži poluživot. Uloga p25 je simultana aktivacija Cdk5 kojom se produljuje njena aktivnost. P25 dovodi i do prekomjerne aktivacije transkripcijskog faktora NF- κ B. On regulira ekspresiju gena koji kodiraju za citokine, faktore raste i enzime. Uslijed disregulacije ekspresije gena dolazi do prekomjerne aktivnosti β sekretaze, nakupljanja citokina koji induciraju upalne procese, propadanje sinapsi te apoptoze živčanih stanica. U oboljelima od AD zabilježena je povišena razina p25 forme, povećana aktivnost Cdk5 kinaze te posljedično prekomjerna fosforilacija Tau proteina [44].

miRNA 125b smanjuje aktivnost DUSP6 (*eng. dual specificity phosphatase 6*), inhibitora MAPK. DUSP6 zauzima ulogu negativnog regulatora kinaza uključenih u MAPK signalni put. Defosforilirajući fosfoserin/treonin i

fosfotirozin ostatke dovodi do inhibicije MAPK kinaza. Nadalje, miRNA 125b stišava ekspresiju gena koji kodira za PP1CA (*eng. serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit*). Fosfataza 1 ima bitnu ulogu u regulaciji staničnih procesa: stanične diobe, sinteze proteina, metabolizma glikogena. U skupini miševa kod kojih je utišan gen PP1CA zabilježena je povišena količina neurofibrilarnih čvorova [43].

11.2. miRNA 34a

Nakon sazrijevanja i zauzimanja određene funkcije, neuron odlazi u Go fazu. To je faza u kojoj se stanica ne dijeli niti priprema za diobu. Pod utjecajem vanjskog signala neuroni mogu prijeći iz Go faze u S fazu, ali diobom ne nastaje funkcionalna stanica već podijeljene stanice odlaze u apoptozu.

Kod oboljelih od AD nakupine A β 42 prekomjerno aktiviraju signalni put MAP-ERK što naposljetku rezultira disregulacijom tumor supresora 73 (TAp73). TAp73 regulira miRNA 34a čija razina mora biti optimalna kako ne bi došlo do apoptoze neurona. Naime miRNA 34a inhibira ekspresiju ciklina D1 koji regulira ulazak stanica u S fazu te inducira procese ključne za nastanak CRNA (*eng. cell cycle-related neuronal apoptosis*). Disregulacija TAp73/miRNA 34a i povećana ekspresija ciklina D1 inducira ulazak neurona u ciklus diobe i naposljetku u programiranu staničnu smrt[45].

miRNA 34a regulira ekspresiju Bcl2 (*eng. B-cell lymphoma 2*), antiapoptotskog proteina koji inhibira aktivnost kaspaze 9 i regulira apoptozu stanica. Kaspaza 9 putem signalne kaskade aktivira kaspazu 3 koja povećava permeabilnost membrane mitohondrija što rezultira otpuštanjem citokroma c i ROS. Eksperimentalni model predstavlja transgenični miš APPSWE/PSEN1 Δ E9 koji sadrži mutiran gen za APP ljudskog podrijetla (*eng. Swedish mutations K594N/M595L*) i mutiran gen za PS1 s delecijom u egzonu 9 (PS1- dE9). Navedene mutacije uzrokuju povišenu razinu miRNA 34a, sniženu ekspresiju Bcl2 te povećanu osjetljivost stanica na apoptozu [42].

11.3. miRNA 137

Posthumnom su analizom u moždanom tkivu pacijenata oboljelih od sporadičnog oblika AD uočene povećane količine sfingolipida ceramida te SPTLC1/2 (*eng. Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 1/2*). SPT ključan je enzim u sintezi sfingolipida, a njezinu aktivnost regulira miRNA 137. Supresijom SPT dolazi do smanjene proizvodnje ceramida te usporenog nakupljanja A β plakova. Aktivnost miRNA 137 kontrolira MeCP2 (*eng. methyl CpG binding protein 2*) vežući se za pet regulatornih regija na miRNA 137. MeCP2 ima bitnu ulogu u sazrijevanju živčanih stanica, formiranju sinapsa te represiji brojnih gena vezivanjem za metilirane nizove citozina i gvanina (*eng. CpG islands*). Kod jedinki miševa koji su konzumirali hranu s visokim udjelom masti zabilježena je povišena razina MeCP2. Povišena razina MeCP2 dovodi do prekomjernog utišavanja miRNA 137, povišene razine SPT i ceramida te patološkog procesuiranja APP-a [46].

11.4. miRNA 181c

Sirtuin gen (SIRT1 gene) kodira za protein sirtuin 1 (SIRT1) koji ima bitnu ulogu u regulaciji staničnih procesa. SIRT1 aktivira pomoćne T 17 limfocite, stimulira autofagiju te inhibira NF- κ B smanjujući učestalost upalnih procesa koji pridonose procesu starenja stanica. Zauzima neuroprotektivnu ulogu stimulirajući neamiloidno procesuiranje APP. Aktivira a sekretazu direktnim vezanjem za promotor ili inhibicijom njezinog supresora, ROCK1 (*eng. rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1*).

miRNA 181c regulira aktivnost SIRT1 direktno se vežući za vezna mjesta unutar 3' UTR područja SIRT1 gena. Kod oboljelih od AD zabilježena je smanjena aktivnost miRNA 181c te povećana aktivnost neuroprotektivnog SIRT1 koji nastoji umanjiti toksični utjecaj A β plakova. S druge strane, snižena ekspresija miRNA 181c ima i negativan učinak na funkciju stanica.

miRNA 181c se komplementarno veže za vezna mjesta na 3' UTR području SPTLC1 gena. Smanjena ekspresija miRNA 181c uzrokuje povišenu razinu SPT, cermida i naposljetku A β plakova [47].

12. miRNA i druge neurodegenerativne bolesti

Osim za predviđanje AD, egzosomalne miRNA su potencijalni biomarkeri i za utvrđivanje drugih neurodegenerativnih i mentalnih bolesti. Kod osoba koje su bolovala od šizofrenije i bipolarnog poremećaja uočena je promjena razine egzosomalne miRNA dobivene iz uzorka prefrontalnog korteksa. Povišena razina egzosomalne miRNA 497 uočena je kod osoba koje su patile od šizofrenije, dok je kod osoba koje su patile od bipolarnog poremećaja zabilježena povišena razina egzosomalne miRNA 29c [48].

13. Zaključak

Alzheimerova bolest je jedna od najučestalijih neurodegenerativnih bolesti te čini oko 60% svih demencija. Prvi znakovi bolesti uključuju gubitak pamćenja i dezorijentiranost u prostoru, dok krajnji stadij bolesti obilježava potpuni gubitak kognitivnih sposobnosti. AD se uglavnom ne otkriva u početnoj fazi jer se simptomi bolesti javljaju tek uslijed njene progresije. Većina lijekova stoga se primjenjuje u uznapredovaloj fazi pa je njihova učinkovitost nedostatna za poboljšanje kognicije i ublažavanje simptoma. Detektiranje dijagnostičkih biomarkera omogućava otkrivanje bolesti u početnoj fazi i time pruža mogućnost sprječavanja napredovanja bolesti. miRNA, mala nekodirajuća molekula, predstavlja potencijalni dijagnostički biomarker za otkrivanje AD. miRNA je uključena u posttranskripcijsku regulaciju ekspresije gena i time zauzima bitnu ulogu u modulaciji funkcije brojnih proteina. Komplementarnim vezanjem za 3'UTR specifičnih mRNA regulira aktivnost proteina i osigurava homeostazu staničnih procesa. Uslijed epigenetičkih modifikacija miRNA te točkastih mutacija na mRNA dolazi do promjene u ekspresiji miRNA i disregulacije aktivnosti proteina, poput BACE1, α i γ sekretaze, neprilisina, itd. Posthumnom analizom moždanog tkiva neboljelih ispitanika (kontrolna skupina) i oboljelih od AD, definirane su optimalne aktivnosti brojnih miRNA. Izolacijom miRNA iz krvi te uspoređivanjem aktivnosti miRNA sa referentnim vrijednostima biti će omogućeno pravovremeno otkrivanje AD. Središte modernih terapijskih pristupa predstavlja sintetska siRNA i anti-miRNA terapija. Današnja istraživanja nastoje modificirati ekspresiju miRNA kako bi spriječili disbalans aktivnosti proteina koji uzrokuje stvaranje ekstracelularnih A β plakova i intracelularnih neurofibrilarnih čvorova. U patološke procese prisutne u AD uključen je velik broj miRNA čiji mehanizam djelovanja i promjenu aktivnosti treba tek utvrditi i precizno definirati, što će onda predstavljati osnovu za razvoj novih terapijskih pristupa u liječenju ove zasad neizlječive bolesti.

14. Literatura

- [1] A. Burns, "Treatment of cognitive impairment in Alzheimer's disease," *Dialogues Clin. Neurosci.*, vol. 5, no. 1, p. 9, 2003.
- [2] G. D. Femminella, N. Ferrara, and G. Rengo, "The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease," *Front. Physiol.*, vol. 6, Feb. 2015.
- [3] "Alzheimer's Signs & Symptoms | Alzheimer's Drug Discovery Foundation." [Online]. Available: <https://www.alzdiscovery.org/alzheimers-disease/signs-and-symptoms>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [4] danablog505, "From the Archives: Reducing Risks of Alzheimer's," *Dana Foundation*, 31-Aug-2015. .
- [5] "Popis stanovništva 2011." [Online]. Available: <https://www.dzs.hr/hrv/censuses/census2011/censuslogo.htm>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [6] C.-M. Chang *et al.*, "GUEST EDITORIAL BOARD MEMBERS," p. 490, 2016.
- [7] "Trends in Alzheimer's drug research," *ResearchGate*. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/blog/post/top-trends-in-alzheimers-drug-research>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [8] "Natural Human Antibodies for Alzheimer Disease | healthPlexus.net." [Online]. Available: <https://www.healthplexus.net/article/natural-human-antibodies-alzheimer-disease>. [Accessed: 02-Aug-2018].
- [9] "Neuroimmuno: Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Rational Basis in Ongoing Clinical Trials," *Neuroimmuno*. .
- [10] S. Salomone, F. Caraci, G. M. Leggio, J. Fedotova, and F. Drago, "New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs: Disease-modifying drugs for Alzheimer's disease," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 73, no. 4, pp. 504–517, Apr. 2012.
- [11] "Significant potential for microRNA blood tests for psychiatric disorders," *ResearchGate*. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/blog/post/significant-potential-for-microrna-blood-tests-for-psychiatric-disorders>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [12] F. Wahid, A. Shehzad, T. Khan, and Y. Y. Kim, "MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1803, no. 11, pp. 1231–1243, Nov. 2010.
- [13] J. C. Akers, D. Gonda, R. Kim, B. S. Carter, and C. C. Chen, "Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies," *J. Neurooncol.*, vol. 113, no. 1, pp. 1–11, May 2013.

- [14] J. Chen, B. Zhao, J. Zhao, and S. Li, "Potential Roles of Exosomal MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Application in Alzheimer's Disease," *Neural Plast.*, vol. 2017, pp. 1–12, 2017.
- [15] R. MacLeod, E.-K. Hillert, R. T. Cameron, and G. S. Baillie, "The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease," *Future Sci. OA*, vol. 1, no. 3, Nov. 2015.
- [16] M. O. W. Grimm, J. Mett, H. S. Grimm, and T. Hartmann, "APP Function and Lipids: A Bidirectional Link," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 10, Mar. 2017.
- [17] R. J. O'Brien and P. C. Wong, "Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, no. 1, pp. 185–204, Jul. 2011.
- [18] J. H. B. M. Neal Waxham, *From molecules to Networks*, vol. 3rd Edition. Academic Press, 2014.
- [19] E. F. Goodall, P. R. Heath, O. Bandmann, J. Kirby, and P. J. Shaw, "Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, 2013.
- [20] F. An, G. Gong, Y. Wang, M. Bian, L. Yu, and C. Wei, "MiR-124 acts as a target for Alzheimer's disease by regulating BACE1," *Oncotarget*, vol. 8, no. 69, Dec. 2017.
- [21] M. Müller, L. Jäkel, I. B. Bruinsma, J. A. Claassen, H. B. Kuiperij, and M. M. Verbeek, "MicroRNA-29a Is a Candidate Biomarker for Alzheimer's Disease in Cell-Free Cerebrospinal Fluid," *Mol. Neurobiol.*, vol. 53, no. 5, pp. 2894–2899, Jul. 2016.
- [22] V. W. Chow, M. P. Mattson, P. C. Wong, and M. Gleichmann, "An Overview of APP Processing Enzymes and Products," *NeuroMolecular Med.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2010.
- [23] S. N. Hajjari, M. Mehdizadeh, S. Sadigh-Eteghad, D. Shanehbandi, S. Teimourian, and B. Baradaran, "Secretases-related miRNAs in Alzheimer's disease: new approach for biomarker discovery," *Neurol. Sci.*, vol. 38, no. 11, pp. 1921–1926, Nov. 2017.
- [24] A. L. Brunkan and A. M. Goate, "Presenilin function and gamma-secretase activity," *J. Neurochem.*, vol. 93, no. 4, pp. 769–792, May 2005.
- [25] B. Mallick and Z. Ghosh, "A complex crosstalk between polymorphic microRNA target sites and AD prognosis," *RNA Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 665–673, Jul. 2011.
- [26] D.-S. Wang, D. W. Dickson, and J. S. Malter, " β -Amyloid Degradation and Alzheimer's Disease," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2006, pp. 1–12, 2006.
- [27] J. Avila, J. J. Lucas, M. Pérez, and F. Hernández, "Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 2, pp. 361–384, Apr. 2004.
- [28] J. Zhao *et al.*, "The Role of MicroRNAs in A β Deposition and Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease," *Front. Neurol.*, vol. 8, Jul. 2017.
- [29] M. Lagraoui, G. Sukumar, J. R. Latoche, S. K. Maynard, C. L. Dalgard, and B. C. Schaefer, "Salsalate treatment following traumatic

- brain injury reduces inflammation and promotes a neuroprotective and neurogenic transcriptional response with concomitant functional recovery," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 61, pp. 96–109, Mar. 2017.
- [30] "Tau Protein Leads To Neuronal Death in Alzheimer's." [Online]. Available: <https://alzheimersnewstoday.com/2014/11/03/tau-protein-leads-to-neuronal-death-in-alzheimers/>. [Accessed: 03-Aug-2018].
- [31] "What APOE Means for Your Health | Cognitive Vitality | Alzheimer's Drug Discovery Foundation." [Online]. Available: <https://www.alzdiscovery.org/cognitive-vitality/blog/what-apoe-means-for-your-health>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [32] "Alzheimer's Disease Genetics Fact Sheet," *National Institute on Aging*. [Online]. Available: <http://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>. [Accessed: 28-Jul-2018].
- [33] L. Puglielli, B. C. Ellis, A. J. Saunders, and D. M. Kovacs, "Ceramide Stabilizes β -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme 1 and Promotes Amyloid β -Peptide Biogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 22, pp. 19777–19783, May 2003.
- [34] R. Ricciarelli *et al.*, "Cholesterol and Alzheimer's disease: A still poorly understood correlation," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 12, pp. 931–935, Dec. 2012.
- [35] S. E. Wahrle *et al.*, "Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease," *J. Clin. Invest.*, Jan. 2008.
- [36] B. Wolozin, "Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated With 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors," *Arch. Neurol.*, vol. 57, no. 10, p. 1439, Oct. 2000.
- [37] S. M. Lehmann *et al.*, "An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 6, pp. 827–835, Jun. 2012.
- [38] D. V. Hansen, J. E. Hanson, and M. Sheng, "Microglia in Alzheimer's disease," *J. Cell Biol.*, vol. 217, no. 2, pp. 459–472, Feb. 2018.
- [39] A. K. A. Shiv Pillai, *Basic immunology*, vol. 5th edition. Sveučilište u Splitu "Medicinski fakultet," 2016.
- [40] G. Lugli *et al.*, "Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 10, p. e0139233, Oct. 2015.
- [42] M. Miya Shaik, I. Tamargo, M. Abubakar, M. Kamal, N. Greig, and S. Gan, "The Role of microRNAs in Alzheimer's Disease and Their Therapeutic Potentials," *Genes*, vol. 9, no. 4, p. 174, Mar. 2018.
- [43] R. Dehghani, F. Rahmani, and N. Rezaei, "MicroRNA in Alzheimer's disease revisited: implications for major neuropathological mechanisms," *Rev. Neurosci.*, vol. 29, no. 2, pp. 161–182, Feb. 2018.
- [44] F. A. Dhariwala and M. S. Rajadhyaksha, "An Unusual Member of the Cdk Family: Cdk5," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 351–369, May 2008.
- [45] P. K. Modi, S. Jaiswal, and P. Sharma, "Regulation of Neuronal Cell Cycle and Apoptosis by miR-34a," *Mol. Cell. Biol.*, p. MCB.00589-15, Oct. 2015.

- [46] H. Geekiyanage and C. Chan, "MicroRNA-137/181c Regulates Serine Palmitoyltransferase and In Turn Amyloid , Novel Targets in Sporadic Alzheimer's Disease," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 41, pp. 14820–14830, Oct. 2011.
- [47] N. Schonrock, D. T. Humphreys, T. Preiss, and J. Götz, "Target Gene Repression Mediated by miRNAs miR-181c and miR-9 Both of Which Are Down-regulated by Amyloid- β ," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 46, no. 2, pp. 324–335, Feb. 2012.
- [48] A. M. Ardekani and M. M. Naeini, "The Role of MicroRNAs in Human Diseases," vol. 2, no. 4, p. 19, 2010.